

## BIOQUIMICA DINAMICA DEL PARENQUIMA PULMONAR

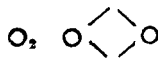
Dr. P. PUIG MUSET

CUANDO se estudia el proceso de la respiración, por lo general sólo se tienen en cuenta dos aspectos: la respiración externa, consistente en el intercambio gaseoso que se produce en el pulmón entre la sangre y el aire alveolar, y la respiración interna, en la que el intercambio gaseoso se verifica entre la sangre y las células de los tejidos.

Nuestro propósito es llamar la atención sobre el hecho de que el proceso respiratorio en el pulmón tiene unos caracteres muy peculiares, debido a que, al margen de la respiración externa, motivada por el contacto directo con el oxígeno, en el parénquima pulmonar asientan procesos de tipo peroxidativo, que interesa conocer dada su importancia fisiopatológica.

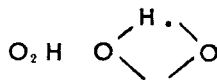
El oxígeno que entra en contacto con el tejido pulmonar es el *oxígeno molecular* formado por dos átomos, de tipo radical, que no pueden existir al estado libre. Esquemáticamente, podemos considerar el oxígeno molecular como dos átomos, unidos por sus dos electrones compartidos, que determina su

divalencia en la siguiente forma:



Este oxígeno molecular puede fijarse directamente sobre la hemoglobina dando lugar a la oxihemoglobina, de la que ahora omitimos ocuparnos.

Su intervención en un proceso reaccional, propiamente dicho, puede tener las fases siguientes: que sature uno sólo de sus electrones, en cuyo caso se forma el radical hidroperoxo

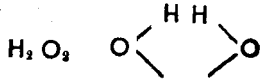


o que dicho radical se fije directamente a un componente que tenga otro electrón lábil, y se forme un hidroperóxido.

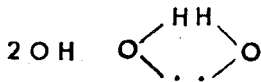


Si se saturan dos electrones, pueden originarse los componentes siguientes:

una molécula de  $H_2 O_2$  o peróxido de hidrógeno

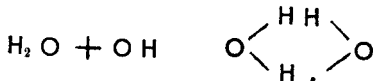


o dos oxhidrilos, radicales, libres.

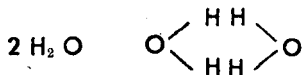


En este último caso, al unirse un electrón libre a un compuesto, se origina un proceso de hidroxilación de primordial importancia en todo el metabolismo.

Si se saturan tres electrones se forma una molécula de agua y un hidroxilo.



Y, en el caso de que se saturen los cuatro electrones, se forman dos moléculas de agua.



Y, en el caso de que se saturen nemos tan sólo llamar la atención sobre esta formación de hidroperóxidos, debido especialmente a que se combinan fácilmente con los lípidos, y por formar parte de la membrana de las células del pulmón son los primeros en contactar con el oxígeno. Y de estos lípidos, los ácidos grasos insaturados son

los que directamente reaccionan con el oxígeno dando lugar a la formación de lipoperóxidos.

El hecho de que en la superficie alveolar se forme un exceso de peróxidos y lipoperóxidos, responsables de una alteración patológica, se debe teóricamente a diversos factores: cabe considerar como factores exógenos una mayor concentración de oxígeno en el medio; los efectos de las radiaciones y rarioterapia, que catalizan la formación de radicales peróxido; también deben tenerse en cuenta los factores de tipo infeccioso y endógenos.

En esta ocasión, nos referimos a unos ensayos que estamos efectuando sobre la importancia patológica que deriva de la presencia de algunos enzimas o la disminución de otros en el tejido pulmonar.

En unas experiencias sobre la peroxidación enzimática vimos que en la intoxicación aguda por lipoxidasa, en dosis de 300 mg. o más por Kg., el animal (rata o ratón) muere con fuerte disnea respiratoria y que en el examen postmortem el hallazgo más destacado es la existencia de un gran exudado seroso en la cavidad pleural (8 c. c. y aún más para un animal de 150 gramos).

En el examen histológico se aprecia una infiltración neumónica de primer período entre la fase de extravasación y la de hepatización roja. Los alveolos se observan repletos de sangre, y se encuentran

histiocitos con granulaciones lipóideas.

Este hallazgo permite interpretar que la muerte por asfixia del animal ha sido debida a que esta gran cantidad de exudado ha llegado a obturar totalmente la superficie alveolar, impidiendo el intercambio gaseoso que motiva la consiguiente anoxia fatal.

En los animales que fueron tratados durante un mes con lipoxidasa por vía oral y que no presentaron sintomatología respiratoria apreciable, el examen histológico demuestra integridad del parénquima pulmonar, pero existen lesiones semejantes a las que aparecen en la bronquitis crónica.

Después de estas dos observaciones, decidimos ensayar la acción de la lipoxidasa por aerosol, o sea, una prueba paralela a la acción tópica que habíamos ensayado frente a las lesiones dérmicas.

Las experiencias se llevaron a cabo con ratas. El primer grupo fue tratado durante 10 minutos por un aerosol de lipoxidasa en suero fisiológico (20 mg.  $\times$  ml.). El gas utilizado fue el oxígeno a una atmósfera, en la forma en que habitualmente se emplea para el estudio de fármacos y del que se conoce que por sí sólo no produce lesión pulmonar.

En el mismo día, otro lote de ratas fue tratado en igual forma, pero el líquido del aerosol contenía, además de lipoxidasa, catalasa (20 mg.  $\times$  ml.).

Los animales no experimentaron trastorno aparente durante la sesión de aerosol, ni una vez separados de la cámara.

Uno de los animales de cada grupo fue sacrificado inmediatamente y en el examen histológico de sus pulmones pudo observarse que en los tratamientos sólo por lipoxidasa había grupos de alveolos con exudado seroso que incluso se hace hemorrágico. No existiendo con juntamente al edema aumento de células inflamatorias. asimismo las lesiones bronquíticas son mínimas.

En los que fueron tratados por lipoxidasa más catalasa hay una infiltración intersticial subaguda granulomatosa, sin fenómenos de edema pulmonar. Asimismo no existen lesiones de bronquitis y sólo un aumento de volumen de los ganglios peribronquiales de los bronquios grandes. Se encuentran algunas áreas de enfisema, seguramente en relación a las áreas granulomatosas.

En otro ensayo al aerosol, a igual concentración, se mantuvo durante 20 minutos, siendo los resultados de conjunto y del examen histológico muy parecidos.

Otros lotes de ratas que por espacio de una hora fueron sometidos a idéntica aerolización, durante la experiencia manifestaron alguna molestia, evidenciable por su apatónamiento y dificultad respiratoria, aunque no muy intensa, seguida de intensos frotamiento de la nariz, como es conocido en los

procesos de anafilaxia experimental.

Una vez separados de la cámara, los animales se recuperaron aparentemente. A las 24 horas y a los 3 días, se sacrificaron algunas ratas de cada lote, para practicar el examen histológico de pulmón.

El dictamen indica haberse encontrado el mismo tipo de lesiones observadas en la prueba anterior. Es decir, en el grupo tratado sólo con lipoxidasa; tanto en el primer día como a los 3 días se observa edema e infiltración hemorrágica por zonas, alternando con otras que presentan un aspecto normal.

En los que fueron tratados con lipoxidasa y catalasa se observa un cuadro semejante, pero menos intenso. Existe, además, ligera infiltración de células parenquimatosas, septales de tipo crónico.

Tenemos, por tanto, que la inyección intraperitoneal de una dosis elevada de lipoxidasa, su administración oral en forma prolongada o crónica, o en aerosol, ocasiona unas alteraciones en el parénquima pulmonar que, según la vía y dosis empleada, van desde una neumonía exudativa a una bronquitis complicada de tipo enfisematoso.

Creemos nosotros que estos resultados debemos también considerarlos como algo más que una simple manifestación tóxica de un producto químico irritante.

Se trata de un enzima de naturaleza proteica, de la cual sabemos

que su acción fundamental consiste en producir lipoperóxidos con los ácidos grasos insaturados, constitutivos de los lípidos existentes en todo el organismo animal. Por lo que respecta concretamente al pulmón, Policard describe que la membrana de las células alveolares está constituida fundamentalmente por una capa de lípidos de unos 30A de espesor.

Pues bien, razonando a través de estos últimos datos, no es de extrañar que los agentes capaces de inducir la formación de lipoperóxidos produzcan alteraciones pulmonares, muy especialmente de este órgano que está en contacto directo y en metabolismo activo con el oxígeno molecular atmosférico. Nosotros acabamos de ver la acción de uno de estos agentes properoxidativos: la lipoxidasa, pero un cuadro pulmonar semejante, aunque no de tanta intensidad, había sido ya visto por nosotros en ratas sometidas a atmósfera con altas tensiones de oxígeno durante varios días y también ha sido descrito por muchos otros investigadores con el nombre de «efecto Lorrain-Smith». También es conocido que en los tratamientos de radioterapia general o en los de tórax aparece una llamada radioneumonitis. Y se conoce y utiliza en la clínica el sinergismo entre hiperoxigenación y radioterapia.

Por otra parte, varios investigadores, especialmente Gerschman y col. señalan que la acción de las

radiaciones y la intoxicación por el oxígeno tienen el mecanismo común de la formación de peróxidos. De ahí que nuestros resultados con la lipoxidasa nos inducen a considerar que a aquel mecanismo peroxídico común puede ser incluido el del enzima lipoxidasa.

Pero si bien estos tres agentes (Rayos X, altas tensiones de oxígeno y lipoxidasa) pueden generar una patología pulmonar, bien sabido es que en la etiopatogenia de las afecciones pulmonares se toman especialmente en consideración otros dos agentes causales; el frío y las infecciones, ya sean microbianas o víricas.

Examinemos ahora, pues, algunas de las características de estos factores.

*Frío y lipoperóxidos.* Es perfectamente conocida por la física elemental de los gases que la solubilización del oxígeno varía inversamente al aumentar la temperatura del líquido. Por otra parte, debido a que el coeficiente de solubilidad del oxígeno en el agua es prácticamente el doble que el del nitrógeno, resulta que la relación entre la cantidad de dichos gases que se encuentra en disolución es diferente a la que normalmente existe en el aire, doblándose la cantidad de oxígeno disuelto con sólo la diferencia de 30° a 0°, ya que pasa de 5,1 ml. a 10,2 ml.

Para comprobar si esta mayor solubilización del oxígeno puede fa-

cilitar una mayor formación de lipoperóxidos, planeamos el siguiente ensayo.

Se prepararon cuatro matraces conteniendo cada uno 60 ml. de agua, 3 ml. de ácido linoléico, 3 ml. de tampón citrato 0,1 M (pH 6,5). Un matraz se mantuvo a temperatura ambiente (18°), otro en un b.m. a 45°, otro en baño a 0°, todos ellos durante dos horas. Y el cuarto fue alternando cada 15 min. de 0° a 45° y viceversa, también durante dos horas. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de cada matraz y se determinaron los lipoperóxidos formados utilizando el método de Summer. Las extinciones leídas fueron las siguientes:

Temperatura ambiente (18°)	32
Mantenido a 45°	19
Mantenido a 0°	32,5
Alternando de 45° a 0°	29

O sea, que en los matraces mantenidos a temperatura ambiente y baja, hay mayor formación de lipoperóxidos, siguiendo el del matraz que fue alternativamente enfriado y calentado, quedando con la menor cantidad de oxígeno peroxídico el que se mantuvo a 45°.

Parece, por tanto, que el frío facilita la formación de lipoperóxidos. Si a esto añadimos que en muchos procesos patogénicos de pulmón el aumento de frío viene en forma de renovación de aire frío y con posible mayor pureza del mismo, se puede apreciar como este dato que consignamos, pese a su

simplicidad, puede tener hondo significado. En otros tejidos puede tenerse también en cuenta que el frío determina una isquemia con menor aporte en el tejido de factores defensivos en general y antihialuronidasa en particular, como nosotros señalamos hace algún tiempo. Veamos ahora otro aspecto.

*Infecciones pulmonares y metabolismo oxidativo.* Es perfectamente conocido que muchas bacterias producen en su metabolismo peróxido de hidrógeno y, asimismo, que contienen catalasa. Existen bastantes estudios sobre la formación de  $H_2O_2$  por los pneumococos (Annear y Dorman) y Hemophilus influenza (Gilder y Gرانick), señalando que el acúmulo de éste llega incluso a matar el cultivo si no existen en el mismo agentes capaces de destruirlo (hemoglobina, catalasa, etc.).

Y no vamos a citar el número considerable de estudios que en estos últimos tiempos se están publicando sobre las estrechas relaciones entre el bacilo de Koch, los peróxidos y la catalasa.

Por otra parte, A. J. Lund publicó en 1951 que «existe evidencia definitiva de que muchos gérmenes contienen lipoxidasa» y en otro estudio, en colaboración con H. O. Halvorson, indicaba que la formación de lipoperóxidos en los medios con gérmenes o tejidos que contienen lipoxidasa, aquellos se aumen-

tan en función de la baja temperatura.

Supeditados al sentido de estos datos y criterios, hemos efectuado las siguientes experiencias:

Se prepararon 8 tubos de ensayo, conteniendo cada uno: 10 ml. de caldo de cultivo bacteriológico común, 0,5 mg. de Acido linoléico y 0,1 mg. de Tween 80.

Los dos primeros se dejaron como blanco y los otros, dos a dos, se sembraron respectivamente con Micrococcus catharralis, Streptococcus y Staphilococcus.

Los gérmenes utilizados nos fueron facilitados por el Laboratorio Municipal de Barcelona y procedían de enfermos con afecciones pulmonares. No se ha utilizado el pneumococo por dificultad entre su medio de cultivo con sangre y la reacción coloreada que nosotros utilizamos.

Después de mantener el crecimiento en la estufa a 37º durante 48 horas, se esterilizaron todos los tubos por filtración (con placa de Membranfilter Sartorius para cada uno de ellos) y en los líquidos filtrados se determinaron los lipoperóxidos formados por una técnica paralela a la de Summer, consistente en añadir a 5 ml. del filtrado: 5 ml. de agua, 1 ml. de Acido clorhídrico concentrado, 0,2 ml. de sulfato ferroso amónico al 2,5 por 100 en ClH al 3 por 100 y transcurridos 15 minutos, añadir 1 ml. de sulfocianuro amónico al 20 por 100 para desarrollar el color.

Los valores obtenidos se exponen en la Tabla.

Como puede apreciarse, no se encontró en los tubos sembrados aumento de lipoperóxidos, sino una disminución de los mismos respecto a los tubos de control. Ello lo interpretamos como debido a la presencia de catalasa en estos cultivos.

Para aclarar este punto se planteó otro experimento, consistente

en experiencia. Los valores se expresan en la misma Tabla.

Como puede apreciarse en estos resultados, se evidencia un aumento de oxígeno peroxídico, lo cual creemos puede interpretarse en el sentido de que dichos microorganismos son capaces de inducir la formación de hidroperóxidos del ácido linoléico.

O sea, que bioquímicamente puede existir cierto paralelismo o me-

	<i>Sin EDTA</i>		<i>Con EDTA</i>		
	$\Delta E$	$\Delta E$	<i>2 horas</i>		<i>24 horas</i>
			$\Delta E$	$O_2$ fijado	$\Delta E$
<i>Catharralis</i>	7	20	4'75	16	3'55
<i>Streptococcus</i>	8	20	4'75	16	3'55
<i>Staphilococcus</i>	6'5	30	4'75	16	3'55

en disponer y sembrar los tubos conteniendo exclusivamente caldo de cultivo. Pasadas las 48 horas de permanencia en la estufa, se añadió a cada tubo 0,33 gr. de tetracetato de etilendiamina, sal sódica, que es un potente inhibidor de la catalasa y no inhibe la lipoxidasa de la soja (de la cual es conocido que no contiene grupo prostético metálico o de otro tipo).

Se dejó en reposo y después de 1 hora se agregó 0,5 mg. de ácido linoléico. A las 2 y 24 horas, respectivamente, se determinaron los lipoperóxidos como en la primera

canismo común entre la acción de los gérmenes y la que hemos visto produce la lipoxidasa.

Pudiendo, en determinados procesos, sumarse las acciones patológicas lipoperoxidativas de los gérmenes, del frío y lipoxidásicas.

Consideraciones de este tipo podríamos hacer en relación a las infecciones producidas por los denominados adenovirus. A propósito de los cuales sólo queremos recordar los siguientes datos.

Magill y Francis demostraron la incapacidad del virus gripal de proliferar en medios de tejidos con

anaerobiosis. Resultados confirmados por Ackermann operando bajo nitrógeno y por Eaton, simplemente disminuyendo el oxígeno. Mulder también lo confirma trabajando con virus de la pneumonía del gato.

Kalter demostró que en los ratones en hipoxia no progresaba la infección vírica. Dato confirmado por Berry y col. con referencia a la infección gripal. O sea, que según G. Gastaigne, «cuando el oxígeno llegado al pulmón, o cerebro, disminuye, la proliferación de virus en estos tejidos es netamente reducida». Y no olvidemos que es precisamente a partir de este elemento que se forman los lipoperóxidos.

Seller, en 1954 y 1956, indicó que en muchas infecciones víricas, así como en algunos procesos puramente irritativos, en el pulmón hay un incremento de actividad de la xantino-oxidasa, enzima en cuya actuación se forma constantemente peróxido de hidrógeno.

No debe tampoco desdeñarse la extensa serie de estudios de los japoneses Yamafuji y col. sobre la estrecha relación, incluso biogénica, entre peróxidos y virus, punto al que se llega en muchos otros estudios de Radiobiología.

La deducción que hacemos en relación a la que hemos expuesto es que la hiperformación de lipoperóxidos, que provocamos mediante la lipoxidasa y que va seguida de importantes alteraciones de la función pulmonar, podría asi-

mismo ser un factor a tener en cuenta en algunos procesos patógenos que afectan a dicho órgano.

Este aspecto, además de tener interés desde el punto de vista patogenético, permitiría estudiar un nuevo camino terapéutico. De momento explicaría la acción que se ha dicho tiene la clorpromacina en el edema de pulmón experimental y en la bronconeumonía de la infancia. Nosotros hemos encontrado que la clorpromazina tiene acción inhibitoria sobre la formación de lipoperóxidos; acción que se encuentra asimismo en otros fármacos y en mayor intensidad.

Es posible que junto a estas acciones de la lipoxidasa jueguen otras alteraciones que la misma produce en el organismo animal, tales como las profundas modificaciones que hemos encontrado en sangre, en las fracciones proteínicas y lipoprotéicas del plasma y en los elementos leucocitarios, las cuales serán motivo de ulteriores estudios y publicaciones.

Resumiendo, pues, la lipoxidasa inyectada en fuertes dosis (de 300 mg./Kg.) en animales de experimentación, produce trastornos de comportamiento que se manifiestan por una corta excitación seguida de prolongada somnolencia, paresia de movimientos y, a veces, parálisis de las extremidades posteriores.

Se presenta después disnea respiratoria que puede terminar con la muerte del animal por la asfixia



producida por un gran exudado pleural que llega a taponar totalmente el alveolo pulmonar, con el cuadro histológico de una pulmonía exudativa. En dosis inferiores se puede observar asimismo pérdida del apetito, de peso y constantemente diarrea.

Haciendo respirar a los animales un aerosol de lipoxidasa, aunque sólo sea 10 minutos, aparece en el pulmón edema y trasudación serosa, que naturalmente es más intensa si el aerosol dura 1 hora.

Si conjuntamente a la lipoxidasa se aeroliza catalasa, la alteración pulmonar aparece distinta, menor intensidad y aspecto de tipo crónico enfisematoso.

Asimismo hemos encontrado una sumación de efectos tóxicos entre irradiación Roentgen y tratamiento por lipoxidasa.

Como sea que los fenómenos observados aquí se han descrito, asimismo, por la intoxicación con altas tensiones de oxígeno, y por la acción de las radiaciones ionizantes, procesos en que también hay constante formación de peróxidos, se considera que estos últimos pueden ser un mecanismo común. Pudiéndose clasificar estas acciones de la lipoxidasa como de tipo radiométrico o las radiaciones como lipoperoxidásicas.

Los anteriores resultados a nues-

tro entender, demuestran cuánta importancia pueden tener los procesos metabólicos peroxidativos del tejido pulmonar en su patogénesis y abren una serie de preguntas sobre el papel que los mecanismos enzimáticos pueden tener en la patogénesis de muchas afecciones respiratorias.

En anteriores estudios nos hemos ocupado de la posible importancia que para la fisiopatología del organismo animal y en especial de su sistema nervioso central pueden tener los peróxidos, sus derivados de estructura radical y sus combinaciones con los lípidos.

Debido a que el estudio analítico cuantitativo de estos cuerpos en los medios biológicos ofrece serias dificultades, derivadas de su poca concentración, y en especial, de su gran inestabilidad, hemos iniciado unos estudios utilizando el enzima lipoxidasa como medio de generar una hiperformación de lipoperóxidos en el organismo tratado y examinar su ulterior comportamiento.

Los resultados que se exponen en las páginas anteriores, a nuestro criterio, aportan como dato de mayor interés el hecho de que realmente la lipoxidasa resulta un medio eficiente para discernir el posible significado que tienen los lipoperóxidos en muy variados y complejos procesos bioquímicos.